1896
Lane Medical Library

Aus dem Laboratorium der medizinischen Klinik in Bonn.

Untersuchungen

über die

Entstehungsweise des Hydrobilirubins

im menschlichen Körper.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doctorwürde

bei der

hohen medizinischen Facultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

vorgelegt

im Januar 1896

von

Joseph Esser

aus Köln a. Rhein.

BONN.

Buchdruckerei von A. Henry.

1896.

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet.

Von Jaffe wurde 1867 zuerst im Harn ein durch seine grüne Fluorescenz nach Chlorzinkzusatz und durch einen Absorptionsstreifen zwischen den Frauenhofer'schen Linien b und F im Spektrum charakterisierter Farbstoff entdeckt, dem er den Namen Urobilin gab, weil er ihn auch in der Galle gefunden hatte und seine Abstammung von den Gallenfarbstoffen für wahrscheinlich hielt. Er versuchte denn auch sein Uribilin chemisch aus dem Bilirubin durch Oxydation mit $N_2 O_5$ darzustellen, erhielt jedoch einen roten Farbstoff, der zwar spektroskopisch aber nicht in anderen Eigenschaften dem Urobilin glich. Was Jaffe mittels der Oxydation nicht gelungen war, erreichte Maly durch starke Reduktion des Bilirubin mit Natriumamalgam. Er erhielt einen Körper, der in all seinen Eigenschaften mit dem Urobilin Jaffes übereinstimmte und nach einer chemischen Analyse aus dem Bilirubin unter Aufnahme von H und $H_2 O$ entstanden war. Maly gab deshalb dem Farbstoff den Namen Hydrobilirubin und führte als seine Hauptcharaktere an:

1) seine rote Farbe in der sauren, seine gelbe in der alkalischen Lösung,
2) seine Absorptionsstreifen und deren Lage in saurer und alkalischer Lösung,
3) die grüne Fluorescenz seines Zinksalzes,
4) seine Fällbarkeit durch Metallsalze in braunen Flocken,
5) das optische Verhalten der ammoniakalischen

Silbersalzlösung, die im durchfallenden Lichte klar und dunkelgelb, im auffallenden trüb und graugrün erscheint.

Doch nicht nur mit dem Urobilin Jaffe's, sondern auch mit dem von Vaulair und Masius konstant in den normalen menschlichen Fäces gefundenen und Stercobilin genannten Farstoff hielt Maly sein Hydrobilirubin für identisch. Diese Ansicht dürfte auch jetzt noch die meisten Anhänger haben trotz der Angriffe von Mac Munn und Le Nobel, von denen ersterer, gestützt auf seine spektroskopischen Untersuchungen über Blut-, Gallen- und Harnfarbstoffe, eine Reihe von urobilinartigen Körpern im Harn unterscheidet und ganz besonders eine Verschiedenheit zwischen normalem und febrilem Urobilin betont. Dank der umfassenden und bedeutungsvollen Untersuchungen von Friedr. Müller und seinem Schüler Dietr. Gerhardt über den sogen. Urobilinicterus, bei denen sich niemals auch nur der geringste Unterschied zwischen den in Frage stehenden Farbstoffen zeigte, ferner durch die vor einigen Monaten veröffentlichten Untersuchungen von Beck, der aus der Galle eines Gallenfistelhundes häufig neben Urobilin einen Farbstoff erhielt, dessen Absorptionsstreifen leicht zur Täuschung Anlass gibt, und so die Ansicht Mac Munn's erklärt, ist die Wahrscheinlichkeit, dass Urobilin und Stercobilin identisch sind, fast zur Gewissheit geworden. Auch wir erklären uns für die Identität genannter Farbstoffe und sprechen daher im folgenden schlechthin von Hydrobilirubin.

Weit auseinander gehen nun aber die Ansichten der verschiedenen Forscher über die Herkunft des Hydrobilirubin, respektive über die Stätte seiner Bildung; ferner sind die Untersuchungen über die Art seines Entstehens keineswegs als abgeschlossen zu betrachten.

Als erster äussert sich über den Bildungsort des

Hydrobilirubin Maly; und zwar verlegt er denselben in den Darm, wo der bei Fäulnis- und Gährungsprozessen entstehende Wasserstoff die Gallenfarbstoffe reduzieren soll. Das umgewandelte Hydrobilirubin diffundiere dann durch die Darmwand, gelange in die Circulation und erscheine schliesslich im Harn als das von Jaffe gefundene Urobilin. Andere, hauptsächlich geleitet durch die Beobachtung des früher angenommenen Urobilinicterus, bei dem der Harn statt Bilirubin nur Hydrobilirubin enthält und letzteres deshalb als die Ursache der Gelbfärbung beschuldigt wurde, bezeichnen verschiedene Organe als die Bildungsstätten des Hydrobilirubin. Kunkel, Kiener und Engel nehmen als solche die Gewebe und das Blut an, französische Autoren, wie Hayem, Dreyfuss-Brissac, Poncet und Tissier die Leber und reden von einer „insuffisance hépatique", die eine vermehrte Bildung des Hydrobilirubin bedinge, und endlich erscheint es Leube und von Jaksch wahrscheinlich, dass die Umwandlung des Bilirubin zu Hydrobilirubin in der Niere vor sich gehe.

Wesentlich geklärt wurde diese Frage durch die schon oben erwähnten Untersuchungen von Friedr. Müller und Dietr. Gerhardt.

Was zunächst die Ansicht angeht, gemäss der das Hydrobilirubin in den Geweben und dem Blut seinen Entstehungsort haben soll, so liegen freilich keine unanfechtbaren Versuche vor, die dieselbe beweisen oder widerlegen. Die Annahme, dass die Leber der Ort der Hydrobilirubinbildung sei, wird zwar gestützt durch die Thatsache, dass in der menschlichen Galle, auch wenn sie frisch erbrochen wird, meist geringe Mengen von Hydrobilirubin nachweisbar sind, ist aber nach Müller deshalb unhaltbar, weil in zwei Fällen von Ikterus mit dem Eintritt des vollständigen Gallengangverschlusses das Hydrobilirubin aus den thonfarbenen Stühlen und dem Urin vollkommen verschwand

und nach dem Tode der betreffenden Patienten auch in der Galle und den Transsudaten nicht gefunden wurde. Unvereinbar ist dies mit der Lehre von einer „insuffisance hépatique", da es doch nicht wohl möglich ist, dass dieselbe Lebererkrankung nur dann zur Urobilinurie führt, wenn der Gallengang nicht ganz verschlossen ist, nicht aber, wenn dies der Fall ist. Ausserdem liesse sich nach Beck die Anwesenheit von Hydrobilirubin in frisch entleerter Galle auch dadurch erklären, dass ein Teil des vom Darm resorbierten Hydrobilirubin den sogen. intermediären Gallenkreislauf mitmacht. Wenn ferner Quincke als Anhänger der Ansicht von der Umwandlung des Bilirubin in den Geweben das Versiegen der Hydrobilirubinausscheidung bei vollständigem Gallengangverschluss so zu deuten sucht, dass infolge zu reichlicher Ablagerung von Bilirubin in den Geweben dessen Umsetzung gehemmt werde, so wird dies dadurch widerlegt, dass die Ausscheidung des Farbstoffs absolut nicht von dem Grade des Ikterus, sondern von dem Offensein oder Verschluss des duct. choled. abhängig ist. Das, was Müller bei Gallengangverschluss fand, widerlegt aber auch die Annahme Leubes und Jakschs. Müsste doch die Niere in einem solchen Falle erst recht viel Hydrobilirubin bilden, da sie ja mehr Bilirubin zur Verarbeitung bekäme. Aber abgesehen hiervon widerlegte Müller letztere Ansicht noch dadurch, dass er durch eine überlebende Hundeniere mit Bilirubin versetztes Blut leitete und in dem secernierten Harne keine Spur von Hydrobilirubin nachweisen konnte. Am allermeisten spricht aber gegen die Annahme einer Bildung des Hydrobilirubin in der Niere die Thatsache, dass sich nach den Untersuchungen verschiedener Autoren (Müller, Gerhardt, von Jaksch, Mac Munn) im Blut, den Ex- und Transsudaten Hydrobilirubin findet,

was bei einer Bildung desselben in der Niere nicht möglich wäre.

So sieht denn Müller übereinstimmend mit der alten Maly'schen Ansicht als einzige, bisher sicher erwiesene Bildungsstätte des in Frage stehenden Farbstoffes den Darm an und erklärt jede Urobilinurie als bedingt durch Resorption des Hydrobilirubin von der Darmwand. Müller stützt diese Ansicht noch durch folgendes Experiment: In einem der oben erwähnten Fälle von vollständigem Gallengangverschluss führte er während mehrerer Tage durch die Schlundsonde 25 bis 125 g hydrobilirubinfreie Schweinegalle in den Magen ein. Am zweiten Tage nach dem Versuch trat im Kot neben etwas unverändertem Bilirubin Hydrobilirubin auf und am dritten Tage zeigte sich letzteres im Urin, um einen Tag nach Sistierung der künstlichen Gallenzufuhr wieder vollständig zu verschwinden. Zu demselben Resultate kam auch Beck nach ähnlichen Versuchen an Gallenfistelhunden.

Ein Analogon hätten wir demnach im Hydrobilirubin zu verschiedenen Stoffen, die sich im Harn finden, wie Phenol, Indican, Cystin, als deren Entstehungsort in neuerer Zeit der Darm erkannt wurde. Im übrigen scheint der Vorgang nicht bei allen Stoffen genau der gleiche zu sein. Wenn z. B. aus Jaffes Versuchen hervorgeht, dass das Jndican höchstwahrscheinlich seinen Ursprung im Dünndarm hat — er fand es nur vermehrt bei Unterbindung des Dünndarms, nicht bei der des Dickdarms von Hunden — so ist der Ort für die Bildung des Hydrobilirubin nach verschiedenen Autoren vornehmlich der Dickdarm.

Zunächst sprechen sich hierfür Müller und Gerhardt auf Grund ihrer Erfahrungen aus.

Ferner Nencki, Sieber und Macfadyen, die Gelegenheit hatten, bei einer Frau mit einem anus prae-

ternaturalis dicht oberhalb der valv. Bauhini die chemischen Vorgänge im menschlichen Dünndarm zu studieren, uud im Inhalt desselben niemals Hydrobilirubin, sondern nur unverändertes Bilirubin fanden. Hieraus ziehen sie den Schluss, „dass der Ort der Reduktionsprozesse speziell der Umwandlung des Bilirubin zu Urobilin nicht der Dünn- sondern der Dickdarm ist.“ Mya (Bologna) glaubt auf Grund seiner Versuche an Hunden zwar die Bedingungen zur Umwandlung des Bilirubin zu Hydrobilirubin im ganzen Darm für vorhanden, erklärt sich jedoch auch dafür, dass sie vom duodenum ab nach der Gegend der valv. Bauhini immer besser werden.

Wohl die bestimmteste Antwort auf die Frage, wo im Darm sich die Umwandlung vollzieht, geben die Untersuchungen, die neuerdings Herr Dr. Ad. Schmidt anstellte, nachdem er gefunden hatte, dass Hydrobilirubin gleichwie es mit Zn Cl_2 die bekannte grüne, mit Hg Cl_2 eine gelb-rote Fluorescenz liefert, während unveränderter Gallenfarbstoff sich mit Hg Cl_2 grün färbt. Er versetzte verschiedene Gewebe mit Hg Cl_2 und fand immer, dass nur der Darm und sein Inhalt, und zwar bei weitem am stärksten in den oberen Teilen des Dickdarms, dicht unterhalb der Klappe und im coecum die Rotfärbung zeigten. Prof. Koester teilte ihm mit, dass er nach Injektionen von Hg Cl_2 von der aorta aus behufs Einbalsamierung von Leichen schon häufiger die ihm unerklärliche Beobachtung gemacht habe, dass sich nur der Darm, vor allem der Dickdarm rothgefärbt zeigte. Der von Zawadzki als Urorosein bezeichnete und für ein Oxydationsprodukt des Urobilin gehaltene Farbstoff ist nach unseren und auch Garrods Untersuchungen offenbar identisch mit dem Quecksilbersalz des Urobilin.

Was verursacht nun die hiernach zweifellos im Dickdarm stattfindende Umbildung des Bilirubin in Hy-

drobilirubin? Zwei Möglichkeiten kommen hier hauptsächlich in Betracht: Entweder entsteht das Hydrobilirubin durch chemische Vorgänge bei der Verdauung resp. durch Fermentwirkung, oder aber es verdankt seine Existenz der Thätigkeit der Darmbakterien.

Bevor ich nunmehr auf unsere Versuche zunächst betreffend die Möglichkeit der Umwandlung durch Fermente (genauer ungeformte Fermente oder nach Kühne Enzyme) näher eingehe, ist es nötig, kurz die Methoden anzugeben, die wir nach längeren Vorversuchen an urobilinhaltigen Urinen von allen bekannten als die zweckmässigsten für unsere — ausschliesslich qualitativen — Bestimmungen erkannt haben.

Wie schon Gerhardt in seiner Arbeit betont, erhält man nach den Methoden von Jaffe und Esoff zwar ziemlich reine Lösungen aber auch Verluste, die bei unseren Untersuchungen unbedingt vermieden werden mussten. So verfuhren wir denn nach dem durch Gerhardt angegebenen, verbesserten Verfahren von Méhu wie folgt:

1) Die zu untersuchende Flüssigkeit wird mit Liebig'scher Barytmischung gefällt,

2) Der Niederschlag mit heissem Wasser ausgewaschen und der überschüssige Baryt durch eine konzentrirte Lösung von schwefelsaurem Natrium gefällt,

3) Das Filtrat mit Schwefelsäure angesäuert und mit Ammoniumsulfat gesättigt,

4) Dic Mischung bei häufigem Umrühren einen Tag stehen gelassen und der Niederschlag mit Alkohol aufgenommen.

In dem so erhaltenen Alkoholextrakt ist der Nachweis des Hydrobilirubin nach Zusatz von $ZnCl_2$ durch die grüne Fluorescenz oder auch spektroskopisch möglich.

Zu beachten ist bei dieser Methode, dass, solange es sich um wässerige Lösungen handelt, stets bei alka-

lischer Reaktion gearbeitet werden muss wegen der, wenn auch nur geringen Fällbarkeit des Hydrobilirubin durch Säuren. Hoppe-Seyler und andere raten sogar an, überhaupt den H_2SO_4 Zusatz zu vermeiden wegen der grossen Zersetzlichkeit des Hydrobilirubin. Die Méhu'sche Methode hat dann auch noch das Zweckmässige, dass durch sie das Chromogen des Hydrobilirubin, auch Leukoverbindung genannt, in dieses selbst übergeht und miterhalten wird.

Als ein einfaches Verfahren zur Untersuchung einer Flüssigkeit auf Hydrobilirubin benutzten wir folgendes von Nencki und Sieber empfohlenes: Die zu untersuchende Flüssigkeit wird mit Essigsäure angesäuert, vorsichtig mit Amylalkohol ausgezogen, der Auszug von verunreinigenden Beimengungen durch Alkohol gereinigt, filtriert und in dem Filtrat durch $ZnCl_2$ Zusatz das Hydrobilirubin nachgewiesen. Häufig zeigt sich bei dieser Art des Hydrobilirubin-Nachweises nicht sofort, sondern erst nach Stunden die Fluorescenz, nachdem das Chromogen in den eigentlichen Farbstoff an der Luft umgewandelt ist; jedoch gelingt es (Hayem) diese Umwandlung durch Zusatz einiger Tropfen einer dünnen Jodlösung bedeutend zu beschleunigen.

Bei den Versuchen über die Wirkung der im Darm enthaltenen Enzyme auf die Bildung von Hydrobilirubin musste vorab jeglicher Einfluss von organisierten Fermenten, den Bakterien, ausgeschlossen werden. Selbstverständlich konnte dies in unserem Falle nicht durch die gewöhnlich geübte, sichere Sterilisirung mit heissem Wasserdampf geschehen, denn dies Verfahren zerstört unwiederbringlich auch die Enzyme. Es mussten vielmehr Mittel in Anwendung kommen, die in bestimmter Konzentration das Leben der Bakterien verhindern können, ohne die ungeformten Fermente wesentlich in ihrer Wirkung zu beeinträchtigen, dann aber auch nicht zer-

störend auf gebildetes Hydrobilirubin einwirken. Als solche boten sich uns die Antiseptica: Bor- und Karbolsäure und Thymol. Am geeignetsten erweist sich nach Salkowski als fäulniswidriges Mittel das Chloroform, das mit Wasser bis zur Sättigung geschüttelt (5 ccm auf 1 l), die organisierten Fermente tötet, sodass die Wirkung der Enzyme rein hervortreten kann; nur für Pepsin und Labferment ist das Chloroformwasser nach Salkowski ein störendes Moment.

Wir verfuhren nun wie folgt:

Das einem soeben getöteten Schweine ohne besondere antiseptische Kautelen etwa handbreit oberhalb und zwei handbreit unterhalb der Ileocöcalklappe mit Einschluss derselben entnommene Darmstück wurde möglichst schnell und durch ganz leichtes Abspülen mit gewöhnlichem Leitungswasser von seinem Inhalt und mechanisch von dem ihm äusserlich anhaftenden Fettgewebe befreit, der Längsrichtung nach in 3 gleiche Streifen zerschnitten und diese in 3 vorher sterilisierte Gefässe mit eingeschliffenem Glasdeckel verteilt. An einem kleinen Stück von allen Streifen wurde vorher die oben angegebene Sublimatprobe von Herrn Dr. Ad. Schmidt gemacht, denn nur, wenn diese positiv ausfiel, konnten wir annehmen, dass in dem betreffenden Darme Bilirubin umgewandelt worden war. Die Gefässe bezeichne ich mit A, B und C. In A wurde reines Bilirubin (aus der Fabrik von Dr. Grübler in Leipzig) in 2 ccm $^1/_{10}$ Normalnatronlauge aufgelöst mit 200 ccm destilliertem Wasser gegossen und 10 ccm Thymolalkohol hinzugefügt. In B goss ich dasselbe jedoch ohne Bilirubin. (Kontrolprobe von A). Den Darmstreifen in Gefäss C spülte ich zuerst leicht mit Chloroformwasser ab, um das in ihm enthaltene Bilirubin und Hydrobilirubin auszuziehen, brachte ihn 5 Stunden mit 10 ccm Thymolalkohol auf 200 ccm dest. Wasser zusammen und fügte

dann erst das Bilirubin, gelöst in 2 ccm $^1/_{10}$ Normalnatronlauge, hinzu.

Alle 3 Gefässe wurden 24 Stunden in den Brütofen gestellt, häufig gründlich umgeschüttelt und dann ihr Inhalt auf Hydrobilirubin und Bilirubin geprüft. Das Resultat war folgendes:

In A waren Spuren von Hydrobilirubin nachweisbar, doch auch in B, woraus folgt, dass diese, schon vorher gebildet, einfach aus der Darmwand extrahiert wurden; in C zeigte sich kein Hydrobilirubin, woraus die Richtigkeit der Erklärung für die Gegenwart von von Hydrobilirubin in A und C hervorgeht. Das zu A und C hinzugefügte Bilirubin fand ich nach der Hupp e r t'schen Gallenfarbstoffprobe unverändert.

Diese Versuche wiederholten wir mehrmals auch mit anderen Antisepticis; genau so mit Karbolsäure und nach der Methode S a l k o w s k i s mit der Aenderung, dass wir das Bilirubin wegen seiner Löslichkeit in Chloroformwasser nicht erst in Natronlauge zu lösen brauchten. Das Chloroform liessen wir bei letzterem Verfahren vor der Probe auf Hydrobilirubin durch leichtes Erwärmen an der Luft verdunsten. Auch stellten wir diese Versuche mit dem Dickdarm eines zu einem anderen Zweck eben durch Verbluten getöteten Hundes an und was wohl von grösserem Interesse sein musste, an dem Darm eines kaum $^1/_2$ Stunde vorher an Scharlach verstorbenen Menschen, in dessen Harn ich während der Krankheit ganz erhebliche Mengen von Hydrobilirubin gefunden hatte. Mit Ausnahme eines Falles, in dem eine Umwandlung deutlich stattgefunden hatte, jedoch auch die Wirkung von Kotbakterien nicht genügend ausgeschlossen war, erhielten wir immer das gleiche negative Resultat, wie bei dem ersten Versuch, auch wenn die Gefässe 2 oder 3×24 Stunden im Brütofen stehen blieben.

War es auf Grund dieser Versuche schon höchst unwahrscheinlich, dass die Enzyme des Darmes die Umwandlung des Bilirubin zu Hydrobilirubin bewerkstelligen, so konnten wir dies weiterhin noch dadurch beweisen, dass wir die nach verschiedenen Methoden ziemlich rein gewonnenen ungeformten Darmfermente direkt auf alkalische Bilirubin-Lösung einwirken liessen.

Als erste dieser Methoden, nach denen wir verfuhren, nenne ich die bekannte von Wittich'sche. Ein etwa 50 cm grosses Darmstück aus der Gegend der Ileocöcalklappe von einem eben getöteten Schweine wurde hiernach mit kaltem Wasser etwas abgespült und von seinem aussen anhängenden Fettgewebe gereinigt, mit der Fleischhackmaschine möglichst fein gehackt, dann getrocknet, gepulvert, gebeutelt und hierauf eine Woche lang gut verdeckt mit Glycerin extrahiert. Das abfiltrierte Extrakt, das selbst eine positive Probe auf Hydrobilirubin lieferte, liess auf Alkoholzusatz die Enzyme ausfallen, die nunmebr zu einer alkal. Bilirubinlösung und mit dieser 24 Stunden in den Brütofen gebracht wurden. Mit einem Teil der Mischung machte ich dann die Huppert'sche Gallenfarbstoffprobe, die kein Hydrobilirubin durch Rotfärbung, sondern Bilirubin durch Grünfärbung nachweisen liess. Mit dem Reste machte ich nun die Méhu'sche Probe auf Hydrobilirubin, die vollständig negativ ausfiel.

Ein weiteres, brauchbares Verfahren zur Isolierung der Verdauungsfermente, die wir zu unseren Versuchen anwandten, giebt Prof. Leo an. Aus frischem Ochsenblut stellten wir uns durch Quirlen desselben Blutfibrin dar, das nach von Wittich die Eigenschaft hat, Fermente aus ihren Lösungen energisch zu absorbieren und sich mit ihnen so fest zu verbinden, dass sie trotz wiederholten Auswaschens mit Wasser an dem Fibrin haften bleiben.

Frisch entleerter diarrhoischer Stuhl, in dem Leo immer der Nachweis aller drei Verdauungsfermente gelungen war, verrührten wir mit 3% Karbolwasser und brachten in den dünnen Brei in einem zugebundenen Gazebeutelchen etwa 5 g des feingeschnittenen, vorher von Blutfarbstoff möglichst gereinigten und gekochten Fibrins. Nach 24stündigem Aufenthalt in den Fäces wurde das Fibrin herausgenommen, mehrmals mit Wasser ausgewaschen und in alkalische Bilirubinlösung gebracht, der wiederum 3% Karbolwasser zugesetzt wurde. Nach 1, 2 und 3 mal 24 Stunden nahmen wir Proben von dieser in den Brütofen gestellten Flüssigkeit; der Nachweis von Hydrobilirubin fiel negativ, der von Bilirubin dagegen positiv aus. Dass von dem Fibrin aus dem diarrhoischen Stuhl auch z. B. Pepsin aufgenommen worden war, konnte ich leicht nachweisen indem ich Teile davon mit einer 0,25% Salzsäurelösung übergoss und im Brütofen vollständig verdauen liess.

Aus den angeführten Versuchen glaube ich somit den bestimmten Schluss ziehen zu dürfen, dass eine Umwandlung des Bilirubin zu Hydrobilirubin durch ungeformte Fermente im Darmkanal vollkommen auszuschliessen ist. Da aber nach den oben angeführten Untersuchungen verschiedener Autoren eine Umsetzung im Darm unzweifelhaft feststeht, können wir als deren Ursache nur die Thätigkeit von Bakterien annehmen. Bevor ich jedoch kurz von den einstweilen noch nicht zum Abschluss gelangten Untersuchungen berichte, die betreffend die Bakterienwirkung auf die Hydrobilirubinbildung namentlich von meinem Kommilitonen Brinck im Laboratorium der hiesigen medizin. Klinik unter Leitung des Herrn Dr. Ad. Schmidt gemacht und mir zur Veröffentlichung freundlichst überlassen wurden, muss ich einige Versuche mitteilen, die wir über die Wirkung verschiedener Organsäfte und des Blutes auf

die Hydrobilirubinbildung im Anschluss an die oben erwähnte von Gerhardt nicht unbedingt widerlegte Ansicht von Kunkel, Kiener, Engel und Quinke anstellten. Sehr zustatten kam uns hierbei die Salkowski'sche Chloroformwassermethode; und zwar untersuchten wir zunächst mittels derselben die sich nach Salkowski im Muskel bei der sogen. Autodigestion bildende reduzierende Substanz auf ihren eventuellen Einfluss auf die Umwandlung von Bilirubin.

Nach der Vorschrift genannten Autors entnahmen wir einem soeben getöteten Hunde Muskelfleisch, zerhackten es möglichst schnell, wogen 100 gr ab, verrieben es mit Chloroformwasser und spülten es in eine vorher gut sterilisierte Glasstöpselflasche. Zum Verreiben und Nachspülen benutzten wir im ganzen 1 l Chloroformwasser, so dass das Verhältnis zwischen Organbrei und demselben 1 : 10 war. Zu der Mischung setzten wir zur vollständigen Sättigung noch einige ccm Chloroform, in denen wir Bilirubin gelöst hatten. 3 × 24 Stunden liessen wir nun die Flasche unter wiederholtem kräftigem Umschütteln in dem Brütofen stehen. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Inhalt filtriert und mit dem Filtrat, das von dem Chloroform durch Verflüchten desselben unter leichtem Erwärmen an der Luft befreit war, die Méhu'sche Probe gemacht. Zur Kontrole stellten wir dieselbe Mischung, doch ohne Bilirubin, auch in den Brütofen. Bei beiden ergab die Méhu'sche Probe kein Hydrobilirubin, die Huppert'sche nur im Hauptversuch Bilirubin. Nach diesem Schema stellten wir nun noch Versuche mit Leber, Niere, Pankreas und Fettgewebe an, ferner mit frischem Blute, das wir direkt mit bilirubinhaltigem Chloroform zusammenbrachten. Das Resultat dieser Versuche war folgendes: In dem Organbrei der Leber liessen sich sowohl im Haupt- als auch im Kontrolversuch geringe Spuren von Hydrobili-

rubin nachweisen, doch mehr Bilirubin, und zwar namentlich im Hauptversuch entsprechend dem Zusatz desselben, so dass wir das Hydrobilirubin als vorher schon vorhanden annehmen mussten. In dem Organbrei des Pankreas, des Fettgewebes der Niere, ferner in dem Blut liess sich kein Hydrobilirubin nachweisen. Unerklärlich ist es uns jedoch geblieben, dass bei letzterem mit Blut angestellten Versuche das zugesetzte Bilirubin auch nicht nachweisbar war, selbst wenn wir die Proben darauf zu verschiedenen Zeiten schon nach 6—12 stündigem Stehenlassen im Brütofen machten. Vielleicht hat dies seinen Grund darin, dass Gallenfarbstoff, wie Gerhardt schreibt, überhaupt schwierig im Blute nachzuweisen ist. Bemerkenswert ist ferner, dass das Pankreas, wenn es nicht besonders gründlich mit Chloroformwasser verrieben war, sehr leicht Fäulnis zeigte, bei der dann eine Umsetzung des Bilirubin zu Hydrobilirubin, wahrscheinlich durch Bakterienwirkung, stattfand. Es ist dies wohl den nach Tiegel und Billroth im Pankreas des noch lebenden Organismus regelmässig vorhandenen Bacterienkeimen zuzuschreiben, die sich nach den interessanten Untersuchungen von Koukol-Jasnopolski auch in der Leber während des Lebens befinden, und, was wir dahingestellt lassen wollen, immerhin an der Hydrobilirubinbildung beteiligt sein könnten.

Unstreitig ist demnach die Umwandlung des Bilirubin zu Hydrobilirubin an die Anwesenheit von Bakterien gebunden und findet sicher im Darm statt, wohl kaum, wie die letzte Versuchsreihe zeigte, ohne Bakterien im Blut und in den Geweben.

Folgende Untersuchungen wurden nun über die Wirkung der Darmbakterien auf die Umwandlung des Bilirubin zu Hydrobilirubin von uns angestellt.

Von hydrobilirubinhaltigen Fäces (Sublimatprobe)

wurde in eine bilirubinhaltige Bouillon geimpft (Bilirubin wurde in 1 ccm $^1/_{10}$ Normalnatronlauge gelöst der Bouillon zugesetzt), die sich, um nur anaerobes Wachstum zu gestatten, in den hierzu geeigneten, von Herrn Dr. Ad. Schmidt angegebenen Röhrchen befand*). Zum Impfen, bei dem zum schnelleren und sorgfältigeren Arbeiten immer 2 Personen beteiligt waren, wurde ein frisch entleerter Fäcalteil benutzt. Dieser wurde mit einem vorher ausgeglühten Messer durchschnitten, die ebenfalls ausgeglühte Platinnadel in die Mitte der Schnittfläche eingestochen und die ihr anhaftenden Partikelchen durch Hin- und Herbewegen möglichst vollständig mit Bilirubinbouillon verrieben und vermischt. Das so geimpfte Röhrchen wurde dann verschlossen in den Brütschrank gestellt. Als Kontrolprobe diente ein mit nicht geimpfter Bilirubinbouillon und ein mit geringen in Wasser suspendierten Kotpartikelchen gefülltes Röhrchen; und zwar ersteres zur Feststellung der Sterilität der zur Verwendung kommenden Bilirubinbouillon, letzteres zur Vergleichung mit dem geringen Hydrobilirubingehalt der zum Impfen gebrauchten Fäces.

In etwa 50 so geimpften Röhrchen liess sich nachher ein starkes Wachstum verschiedener Bakterien, ferner viel Gasentwickelung und eine reichliche Bildung von Hydrobilirubin oder seines Chromogens konstatieren. Letztere begann nach etwa 2 Tagen und hatte nach kaum 7 Tagen ihren Höhepunkt erreicht. Selten war dann freilich alles Bilirubin umgewandelt. Standen aber die Röhrchen noch länger im Brütofen, so fand sich bald kein Hydrobili-rubin mehr in denselben, was vielleicht in einer weitergehenden Reduction des Hydrobilirubin in uns unbekannte Körper

*) Es sind dies etwa 30 ccm fassende, sich unten etwas verjüngende Reagenzgläser, die ein von U-förmig gebogener Glasröhre durchbrochener Gummistopfen verschliesst.

seine Erklärung findet. Man könnte nun gegen obige Versuchsanordnung einwenden, bei der Impfmanipulation hätte eine Verunreinigung der Bouillon mit Luftbakterien stattgefunden und diese wären event. die Umwandler des Bilirubin, doch wird dies dadurch widerlegt, dass wir Röhrchen mit Bilirubinbouillon ½ Tag an der Luft stehen liessen, dann in den Brütschrank brachten und bei der späteren Untersuchung wohl viele Bakterienarten in denselben fanden aber kein Hydrobilirubin. Die Bakterien der Luft bewirken also die Umwandlung nicht.

Eine andere Frage ist die, ob, wie Müller anzunehmen scheint, der Sauerstoff der Luft die Umwandlung behindert. Diese ist zu verneinen, denn es gelang auch in mit Wattepropf verschlossenen, gewöhnlichen Reagenzgläsern bei ungehindertem Luftzutritt Hydrobilirubin zu gewinnen. Allerdings schienen Vergleichsversuche zu ergeben, dass bei anaeroben Wachstum eine grössere Menge von Hydrobilirubin entsteht. In derselben Zeit wie Bilirubin wird auch Biliverdin umgewandelt.

Geschieht der Prozess der Umwandlung der Gallenfarbstoffe zu Hydrobilirubin nun durch die Lebensthätigkeit der Darmbakterien, das heisst wird das Bilirubin von diesen aufgenommen und als Hydrobilirubin ausgeschieden, oder haben wir in demselben eine chemische Wirkung der Stoffwechselprodukte der Bakterien vor uns? Wenn auch schon letztere Annahme durch die Resultate der oben angeführten Fermentversuche, bei denen ja die Stoffwechselprodukte der Bakterien nicht unbedingt ausgeschlossen werden konnten, sehr unwahrscheinlich geworden war, so musste folgender Versuch vollständige Klarheit bringen. Es wurden 2 Röhrchen — A Bouillon + Bilirubin, B nur Bouillon enthaltend — zu gleicher Zeit mit Fäcesbakterien geimpft und 5 Tage in den Brütschrank gestellt. In beiden erfolgte

ein intensives Wachsen der Bakterien, in A Bildung von Hydrobilirubin. Der Inhalt von B wurde im Bakterienfilter, und zwar einem neuen Berkefeld-Filter, filtriert, das selbstverständlich die Stoffwechselprodukte der Bakterien noch enthaltende Filtrat zu einer wässerigen Bilirubinlösung zugesetzt und das Gemisch in den Brütschrank gebracht. Untersuchungen auf Hydrobilirubin, nach 4, 24, 48 und 72 Stunden angestellt, ergaben immer ein negatives Resultat; doch blieb Bilirubin nachweisbar. Was die Wirkung der unter dem Einfluss von Bakterien im Darm gebildeten Gase, vornehmlich des Wasserstoffs, auf die Hydrobilirubinbildung angeht, so werden wir weiter unten hierauf zu sprechen kommen.

Es galt ferner die Frage zu beantworten, ob die das Bilirubin umwandelnden Bakterien auch im Dünndarm anwesend sind, und warum, wenn dies der Fall ist, sich so wenig oder (nach Nencki und Sieber) gar kein Bilirubin im Dünndarminhalt nachweisen lässt. Durch Impfungen mit Dünndarminhalt, welcher frischen menschlichen Leichen und frisch geschlachteten Schweinen aus den oberen Partien des jejunum entnommen war, gelang es nun ebenfalls häufig Bilirubin zu Hydrobilirubin zu reduzieren, sodass also wohl auch dort die Anwesenheit der in Frage stehenden Bakterien angenommen werden muss. Machten wir aber die Bilirubinbouillon vor der Impfung mit Essigsäure schwach sauer, so unterblieb die Umwandlung vollständig, trotzdem sich die Bakterien gut entwickelten. Hieraus lässt sich also der Schluss ziehen, dass sich die Umwandlung nur in alkalischer, resp. neutraler Lösung vollzieht, was dann auch erklärt, dass im Dünndarm, dessen Inhalt Nencki und Sieber immer sauer, andere selten nur schwach alkalisch fanden, Hydrobilirubin meist gar nicht vorhanden ist.

Den Darminhalt des Neugeborenen, das Mekonium, in das noch keine Bakterien von aussen gelangt sind, hatten schon Escherich und Müller auf Hydrobilirubin untersucht, und, da sie solches nicht fanden, geschlossen, das hieran eben das Fehlen der Bakterien schuld sei. Wir prüften nun schon inficiertes Mekonium und den Milchkot von Säuglingen inbetreff der Fähigkeit, Bilirubin zu Hydrobilirubin zu reduzieren, und erhielten in wenigen Fällen ein schwach positives, meist jedoch ein vollständig negatives Ergebnis.

Nach diesen Vorversuchen war es unsere Aufgabe, einzelne Bakterien aus den Fäces zu isolieren und auf ihre Fähigkeit der Hydrobilirubinbildung zu prüfen. Doch stiessen wir hierbei auf grosse Schwierigkeiten.

Zunächst ergaben sich alle die bekannten festen Nährboden für die Züchtung der Fäcesbakterien als unzureichend, einschliesslich des von Mannaberg so warm empfohlenen und von uns auch geprüften Bierwürzeagar. Wenigstens gelang es uns trotz mannigfacher Variation des Impfungsmodus nicht, ausser dem Bact. coli commune mehr als vier verschiedene Mikroorganismen, und zwar zwei Bacillen- und zwei Kokkenarten zu züchten. Die Identificirung dieser vier Arten mit bekannten oder schon einmal beschriebenen Arten ist uns in allen Fällen nicht mit Sicherheit gelungen. Das ist nicht auffallend, wenn man bedenkt, dass viele der überhaupt bekannten Darmbakterien nur einmal, nämlich von dem beschreibenden Autor selbst gesehen worden sind. Ein treffendes Beispiel der Art ist der Bienstock'sche Eiweisbacillus. Bienstock scheint allerdings bei der Züchtung der Fäcesbakterien auf wenig Schwierigkeiten gestossen zu sein, wenn er schreibt: „Bei der Züchtung entwirrt und beschränkt sich das Bakterienchaos der Fäces in ganz überraschender Weise".

Knisl (München) geht im Gegensatz hierzu so weit, dass er sagt, er habe auf Agar und Gelatine fast kein Wachstum von Fäcesbakterien gesehen.

Da wir also auf diesem Wege nicht zum Ziele gelangten, prüften wir diejenigen in dem Darm vorkommenden bekannten Bakterien, die mit Sicherheit isoliert werden können und uns in Reinkultur zugänglich waren, auf die Umwandlung des Bilirubin zu Hydrobilirubin. So von den Gährung erregenden das Bact. coli commune, Bact. lactis aerogenes, den Bac. butyricus, von den Eiweissfäulnis erzeugenden den Proteus vulg. Hauser und den Bac. subtilis, von Kokken einen sich regelmässig findenden, kleinen, verflüssigenden Traubenkokkus (liquefaciens ilei Nencki und Sieber?) und die gelbe Sarcine, endlich von pathogenen Mikrobien den Typhus- und Cholerabacillus. Die Impfungen in schwach alkalische Bilirubinbouillon wurden in der oben beschriebenen Art und Weise vorgenommen; und zwar immer in ein durch Watte verschlossenes Röhrchen für aerobes und in ein Schmidt'sches Röhrchen für anaerobes Wachstum. Nach 3—5 Tagen wurde der Inhalt der Röhrchen zunächst darauf geprüft, ob auch wirklich ein Wachstum stattgefunden hatte, dann ob noch eine Reinkultur vorlag und drittens ob Hydrobilirubin gebildet worden war. Niemals haben wir nun eine Umwandlung des Bilirubin zu Hydrobilirubin erreichen können; ebenso wenig mit den oben genannten vier Arten, die wir nicht identificiren konnten doch jedesmal prüften. Auch nicht gelang uns dies durch Kombination von verschiedenen Arten. Nur ein einziges Mal konstatierten wir nach Abimpfen von einzelnen auf Gelatine gewachsenen Kolonien auf Bilirubinbouillon viel umgewandeltes Hydrobilirubin, ohne dass es uns indessen gelungen wäre, den betreffenden Mikroorganismus weiter zu züchten.

Wenn schliesslich der von manchen als Ursache der Hydrobilirubinbildung angenommene Wasserstoff wirklich als solche anzusehen wäre, müssten wir wohl bei Bac. subtilis und Bac. butyricus, die Wasserstoff produzieren, eine Umwandlung gefunden haben, was jedoch, wie schon gesagt, nicht der Fall war.

Der Vollständigkeit wegen muss ich noch erwähnen, dass der schon mehrmals genannte Prof. A. Beck die in Frage stehende Umwandlung durch Fäulnisbakterien Bact. coli commune, Bac. typh. abdom., Bac. chol. asiat. und Staphyl. pyog. aureus erreicht haben will, was wir nicht unbedingt in Abrede stellen wollen, da seine Versuche insofern von den unsrigen differieren als er dazu keine reinen Bilirubinlösungen, sondern Galle benutzte. Nach den Eindrücken, die wir bei unserer Versuchsanordnung erhalten haben, glauben wir jedoch die Vermutung aussprechen zu dürfen, dass der Hydrobilirubinbildung die Thätigkeit eines Bakteriums zu Grunde liegt, das zu isolieren noch nicht gelungen ist, müssen aber immerhin die Möglichkeit einer Umwandlung durch Symbiose mehrerer Bakterien zugeben. Hoffentlich werden spätere Untersuchungen über die Darmbakterien, unterstützt durch bessere Methoden der Isolierung und Züchtung desselben, auch mehr Klarheit über deren Wirkung bringen.

Zum Schlusse erfülle ich die angenehme Pfiicht, Herrn Prof. Dr. Schultze, Direktor der hiesigen medizinischen Klinik, für die gütige Durchsicht dieser Arbeit meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Zu ganz besonderem Danke fühle ich mich Herrn Privatdozenten Dr. Ad. Schmidt verpflichtet für die Ueberweisung der Arbeit und die Beihülfe, die er mir jederzeit in liebenswürdigster Weise bei der Anfertigung derselben angedeihen liess.

Litteratur.

Jaffe: Arch. f. pathol. Anatomie. Bd. 47.

Maly: Annal. d. Chem. u. Pharm. Bd. 163.

Vaulair u. Masius: Centralblatt f. d. med. Wissenschaft. 1871.

Mac Munn: Brit. med. journ. 1888.

L'e Nobel: Pflüg. Arch. 40.

Müller: Ueber Ikterus (Vortrag).

Dietr. Gerhardt: Ueber Hydrobiltrubin und seine Bezieh. zum Ikterus. Inaug.-Dissert. 1889.

A. Beck: Ueber die Entstehung des Urobilius. Wiener klinische Wochenschr. 1895 Nr. 35.

Kunkel: Virch. Arch. Bd. 79.

Engel und Kiener: Compte rend. soc. biol. 1887, Nr. 14.

Dreifuss-Brissac: De l'ictère hémaphéique 1878 Paris.

Poncet: De l'ictère hépatique traumatique 1874. Paris.

Leube: Verhandl. d. Würzb. phys. Gesellsch. 1888.

v. Jaksch: Klin. Diagn. inn. Krankh. 2. Aufl.

Quincke: Virch. Arch. Bd. 95.

Jaffe: Ueber die Ausscheid. des Indikans unter phys. u. pathol. Verhältn. Virch, Arch. Band 17.

Neucki, Lieber und Macfadyen: Untersuch. über die chem. Vorgänge im menschl. Dünndarm. Arch. für exper. Pathol. und Pharm. Bd. 28.

Mya: Jahresber. der ges. Med. 1887. II. S. 274.

Schmidt: Ueber Hydrobilirubinbildung im Organism. unter norm. Verh. Sep.-Abdr. aus den Verhandl. d. Kongr. f. innere Med, 1896.

Zawadzki: Oxyd. des Urobilius zu Urorosin. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. Bd. 28.

Hayem: Jahresber. d. ges. Med. 1887. I. S. 250.

Hoppe-Seyler: Physiol. u. pathol. chem. Analyse.

Salkowski: Ueber Autodigestion der Organe. Zeitschr. f. klin.

Medizin, Suppl. zu Bd. 17.

Leo: Diagnostik der Krankh. der Bauchorg, 2. Aufl.

Koukol-Jasnopolski: Ueber die Ferment. d. Leber u. Bild von Indol. Pflüger's Arch. Bd. 12.

Nothnagel: Die normalerweise in den menschl. Fäces vorkommenden niedersten Organismen. Zeitschr. f. klin. Medizin. II. Band 3.

Escherich: Die Bakt. im Darmkanal von Säuglingen. Sluttg. 1886.

Bienstock: Ueber die Bakterien der Fäces. Zeitschr. für klin. Med. Bd. 8.

Kuisl: Fortschr. d. Mediz. IV. 1886. Referat.

Vita.

Am 9. April 1873 wurde ich, *Joseph Esser,* katholischer Konfession, als Sohn des jetzigen Königl. Eisenbahn-Direktors *Heinrich Esser* und seiner Gattin *Margaretha,* geb. *Legemann,* zu Deutz-Köln geboren.

Bis Ostern 1883 besuchte ich die Elementarschule, dann bis Ostern 1885 das Königl. Friedrich-Wilhelms-Gymnasium und von da ab das Königl. Gymnasium an Marzellen, wo ich Ostern 1892 das Zeugnis der Reife erhielt. Auf der Universität Bonn widmete ich mich dem Studium der Medizin und bestand am 22. Febr. 1894 das Tentamen physicum. Im Sommer-Semester 1894 studierte ich in München und kehrte im Winter-Semester 1894/95 nach Bonn zurück, wo ich bis jetzt verblieb. Hier bestand ich am 28. Januar 1896 das Examen rigorosum.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

In Bonn: *Binz, Bohland, Dietzel, Doutrelepont, Eigenbrodt, Englert, Finkler, Fritsch, Hertz †, Kékulé von Stradonitz, Kochs, Koester, Litzmann, Lorberg, Ludwig, Nussbaum, Pelman, Pflüger, Pletzer, Saemisch, Schaaffhausen †, Schede, Schiefferdecker, Schmidt, Schultze, Strasburger, Trendelenburg, von la Valette St. George, Witzel.*

In München: *Bauer, Klaussner, Moritz, Rüdinger, Seydel, Wolfsteiner, Ziegler.*

Allen diesen hochverehrten Herren meinen aufrichtigsten Dank!